Enzymologie théorique

I. Introduction – Définitions

A. Enzyme

Protéine présentant des propriétés de catalyse spécifiques d'une réaction chimique du métabolisme de l'être vivant qui la produit.

- L'enzymologie est l'étude des enzymes.
- Le substantif « enzyme » est du genre féminin.
- Toutes les enzymes sont des protéines.
- Les protéines enzymatiques sont des catalyseurs, c'est-à-dire qu'en agissant à des concentrations très petites, elles augmentent la vitesse des réactions chimiques, sans en modifier le résultat. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée.
- Une enzyme donnée est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation, se produisant sur les mêmes corps chimiques initiaux.
- Les protéines enzymatiques sont synthétisées par des êtres vivants. Cette synthèse est déterminée génétiquement : sa conservation dans le génome est favorisée par le besoin qu'éprouve cet être vivant de faire cette réaction.

B. Substrat

Molécule qui entre dans une réaction pour y être transformée grâce à l'action catalytique d'une enzyme.

- Toutes les molécules qui entrent dans une réaction enzymatique et sont définitivement modifiées sont appelées substrats.

C. Produit

Molécule qui apparaît au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.

- La nouvelle molécule qui résulte de cette transformation est appelée produit.

D. Ligand

Corps chimique ayant une liaison spécifique avec une enzyme

- Toutes les molécules ayant une liaison spécifique avec une protéine sont appelées ligands.
- Pour chaque ligand, il existe au moins un site de fixation sur la protéine qui le reçoit.

E. Cofacteur

Corps chimique intervenant obligatoirement dans une réaction enzymatique :

- **pour transporter ou compléter un substrat ;**
- **pour accepter un produit ;**
- **comme participant à la structure de l'enzyme.**

- Les cofacteurs peuvent être des ions comme l'atome de Zinc de l'anhydrase carbonique ou de petites molécules minérales habituellement présentes dans les milieux biologiques, à commencer bien sûr par la molécule d'eau.
- Certains cofacteurs sont des molécules plus complexes synthétisées par les cellules : nous les appellerons coenzymes.

F. Coenzymes

Molécule biologique intervenant comme cofacteur indispensable dans la catalyse enzymatique d'une réaction :

- **les coenzymes libres interviennent dans la réaction de manière stœchiométrique ;**
- **les coenzymes liés interviennent dans la réaction de manière catalytique.**

- Les coenzymes sont des molécules biologiques c'est à dire que leur synthèse naturelle ne peut être faite que par des cellules vivantes. Lorsque cette synthèse n'est pas inscrite dans le patrimoine génétique d'une espèce, alors tout ou partie de la molécule du coenzyme doit être apporté à cette espèce par son alimentation : cet aliment indispensable s'appelle une vitamine. Les coenzymes sont des cofacteurs donc des molécules indispensables à la catalyse enzymatique.
- Lorsque les coenzymes sont liés à l'enzyme par des liaisons de type électrostatique ou plus faiblement encore, cette liaison est renouvelée à chaque réaction effectuée : en effet, l'énergie mise en jeu par la liaison enzyme - coenzyme est du même ordre de grandeur que l'énergie mise en jeu dans la liaison enzyme-substrat ; dans ce cas, la concentration des coenzymes doit être du même ordre de grandeur que celle du substrat (on dit stœchiométrique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes libres parce qu'ils se dissocient de l'enzyme à chaque réaction catalysée.
- Lorsque au contraire les coenzymes sont liés aux enzymes par des liaisons fortes de type covalent, leur concentration est nécessairement la même que celle de l'enzyme, c'est à dire très petite (on dit catalytique). Ces coenzymes sont appelés coenzymes liés parce qu'ils ne se dissocient pas de l'enzyme.

II. Spécificité

A. Notion de spécificité

1. Substrats

Théoriquement, une seule réaction possible, sur un seul substrat

En réalité, il existe une relation structure activité : il faut que la bonne liaison soit placée au bon endroit

- accès possible ⇒ pb de conformation
- réaction possible ⇒ pb chimique (grandeur et nature des forces en jeu)

⇒ il est fréquent qu'une enzyme intervienne non sur une molécule unique, mais sur une classe de substrats.

- Exemple 1 : Galactose épimère en C_4 du glucose, non pris en charge par les enzymes de la glycolyse
- Exemple 2 : ß - oxydation des acides gras - Les enzymes prennent en charge des acyl - CoA. A chaque dégradation, perte d'un motif à 2 carbones, mais les mêmes enzymes fonctionnent sur le nouvel acyl - CoA ⇒ le même motif est reconnu.
- Exemple 3 : RubisCO ⇒ en fait, les deux réactions ne concernent pas les mêmes sites (régulation allostérique).

2. Réaction

En fonction de l'environnement atomique du site catalytique, un seul type de réaction sera possible :

- acide - base
- redox, par échange d'électrons avec des ions métalliques (cytochromes)
- transferts de groupements

B. Classification et nomenclature des enzymes

1. Principe

1961 - 1972 : Enzyme commission ⇒ codification internationale. Un certain nombre d'appellations traditionnelles subsistent, mais l'emploi des numéros de code est aujourd'hui obligatoire dans toutes les publications scientifiques et les documentations techniques et commerciales.

La nomenclature officielle comporte 6 classes, elles-mêmes divisées en sous classes. Le numéro de code spécifie :

1 - le type de réaction (classe)

2 - le type de fonction du substrat métabolisé (sous-classe)

3 - le type de l'accepteur

4 - Le numéro d'ordre (dans la sous-sous-classe).

2. Classes et exemples

1 Oxydoréductases : réaction redox portant sur différents résidus, associant des coenzymes, des cytochromes, des accepteurs comme O_2, …

- EC 1.1.1.67 Mannitol : NAD oxydoréductase = Mannitol DH

  Mannitol + NAD = Fructose + NADH
- EC 1.1.2.3 L - Lactate : ferricytochrome *c* oxydoréductase = Lactate DH

  Lactate + 2 Cyt *c* Fe^{3+} = Pyruvate + 2 Cyt *c* Fe^{2+}

2 Transférases : transfert d'un groupement carboné, phosphoré, azoté, etc. d'une molécule à une autre.

- On distingue parfois les **aminotransférases** : transfert d'un groupement α-NH_2 d'une molécule sur un céto-acide, en position α : on obtient un nouvel acide aminé et les **transaminases** : le NH_2 n'est pas transféré en α : le nouveau composé n'est pas un acide α aminé
- EC 2.6.1.20 L - Tyrosine : pyruvate aminotransférase

  L - Tyr + Pyr = *p* Hydroxyphényl pyruvate + L - Ala
- GOGAT = glutamate oxo-glutarate aminotransférase

Glu + Glu = αKG + Gln

- **Kinase** = Phosphotransférases avec transfert d'un ATP vers une autre molécule
- EC 2.7.1.1 ATP : D - hexose 6 - phosphotransférase = hexokinase

  ATP + D hexose = ADP + D hexose 6 - phosphate
- EC 2.7.1.11 ATP : D - Fructose 6 - phosphate 1 - phosphotransférase = phospho - fructokinase

  ATP + D - Fructose 6 - phosphate = ADP + D - Fructose 1,6 - bis phosphate

3 Hydrolases : liaisons ester, résidus glycosyle, etc.

- EC 3.2.1.4 1,4 (1,3 ;1,4)ß-D-glucan 4-glucanohydrolase = cellulase

  Glucose(n) = Glucose(n-1) + D-glucose

4 Lyases : catalysent l'enlèvement ou l'addition d'un groupement autrement que par hydrolyse

- EC 4.1.1.39 3-phospho D glycérate carboxy-lyase [dimerizing] = RubisCO

  RuBP + CO_2 = 2 A_3PG

5 Isomérases :

- EC 5.3.1.1 D-glycéraldéhyde 3-phosphate céto-isomérase = Triose phosphate isomérase

  Glycéraldéhyde 3 phosphate = Dihydroxy acétone phosphate

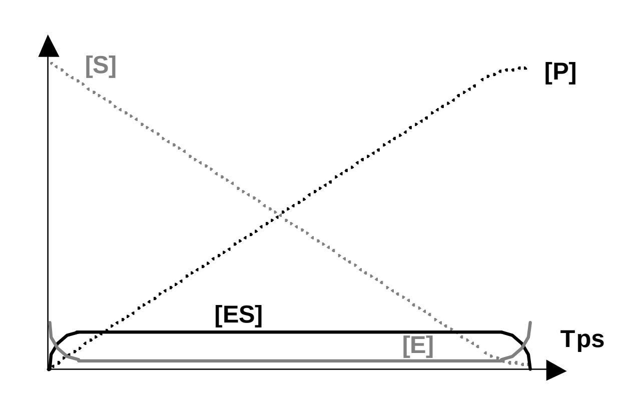
6 Ligases : création d'une liaison entre 2 molécules couplée avec la dégradation d'une liaison à haut potentiel énergétique

- EC 6.4.1.1 Pyruvate : dioxyde de carbone ligase (ADP) = pyruvate carboxylase

  ATP + Pyr + CO2 + H2O = ADP + Pi + oxaloacétate

III. Cinétique michaélienne

A. Notion de vitesse initiale



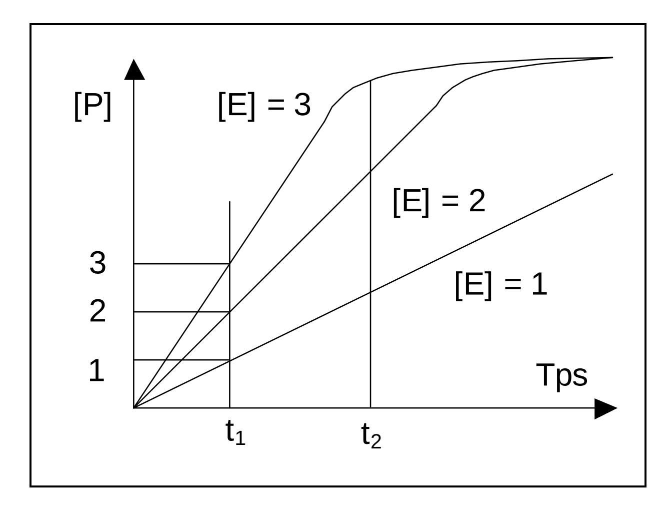
$$S+E \Leftrightarrow ES \Rightarrow E+P$$

Mesure de l'apparition du produit au cours du temps ; Conditions expérimentales : T°, pH, salinité, etc. optimaux

[S] >> [E] et temps court ⇒ on cherche à rester dans les conditions où [S] >> [P]

Dans ces conditions, [S] et [ES] sont considérés comme des constantes : c'est la **phase stationnaire.**

On observe deux parties : 1) pente constante ⇒ vitesse constante, puis 2) apparition progressive d'un plateau ⇒ vitesse diminue : les conditions initiales ne sont plus vérifiées, en particulier à cause de l'épuisement du substrat



B. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse

On augmente progressivement la concentration en enzyme, toutes choses égales par ailleurs.

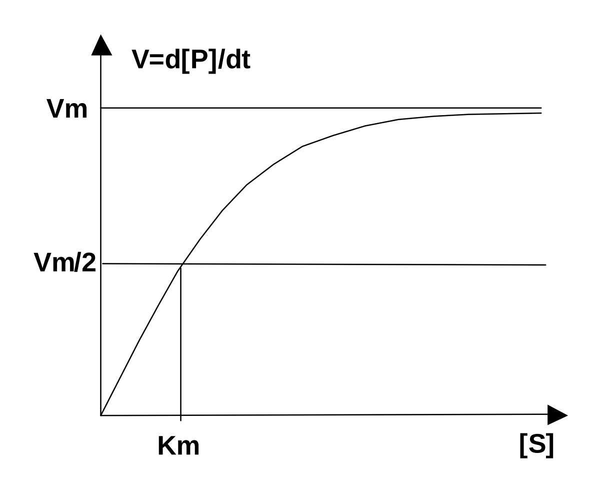
A t1, en condition de vitesse initiale, il y a proportionnalité entre la [E] et la quantité de produit formé. La courbe V = f ([E]) est une droite (V = d[P] / dt)

A t2, les conditions initiales ne sont plus vérifiées ⇒ il n'y a plus proportionnalité.

Théoriquement, toutes les courbes admettent le même plateau, mais dans la réalité, à cause de problèmes de solubilité, il est très difficile d'obtenir un plateau expérimental correct.

C. Influence de la concentration en substrat

1. Equation de Michaelis - Menten (1913)



Dans la suite du cours, sauf mention contraire, on considère qu'on se place en conditions de vitesse initiale = Vi ou V_0 , voire V (selon inspiration !)

On trace la courbe V = f([S]) (attention à ne pas confondre avec la courbe [P] = f(t)!).

Quand [S] augmente, Vi tend vers Vmax

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\Leftrightarrow}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\Leftrightarrow}} E+P$$

on pose : $[E_t]$ = enzyme totale, [ES] = complexe enzyme - substrat, donc $[E_L] = [E_t] - [ES]$ = enzyme libre ; [S] = substrat, avec $[S] >> [E_t]$

2. Vitesse de formation de ES

On néglige la formation à partir de E + P, car [S] >> [E] et on est en Vi ⇒ [P] est très faible : $k_1=([Et]-[ES])[S]$

3. Vitesse de destruction de ES

$$k_1[ES]+k_2[ES]$$

4. Etat stationnaire

La vitesse de formation et la vitesse de destruction de ES sont égales. On cherche à isoler [ES]

$$k_1([Et]-[ES])[S]=k_{-1}[ES]+k_2[ES]\Rightarrow k_1[Et][S]+k_1[S][ES]=[ES](k_{-1}+k_2)$$

$$k_1[Et][S]=k1\,[ES][S]+[ES](k_{-1}+k_2)=[ES](k_1[S]+k_{-1}+k_2)$$

$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S]+k_{-1}+k_2} = \frac{[E_t][S]}{[S]+\left(\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}\right)}$, or $V_i = k_2[ES] = \frac{k_2[E_t][S]}{[S]+K}$, vitesse initiale de formation de P.

On pose $K_m = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$ (car on néglige k_{-2}) et $V_{max} = k_2[E_t]$ car la vitesse est maximale quand toutes les molécules d'enzymes (théoriquement) prennent en charge chacune une molécule de substrat, donc

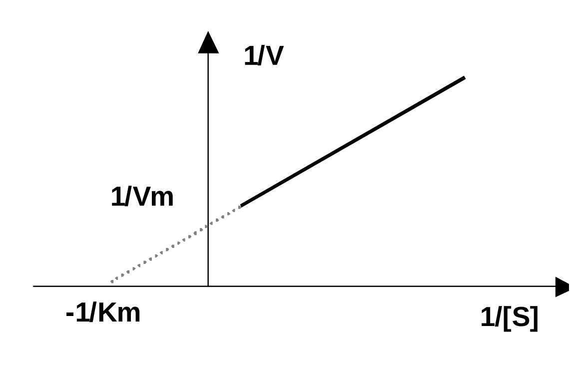
$$V_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$$

$$\text{Si } K_m = [S] \Rightarrow V_i = V_{max}\frac{[S]}{[S]+[S]} = \frac{1}{2}V_{max}$$

D. Représentations graphiques

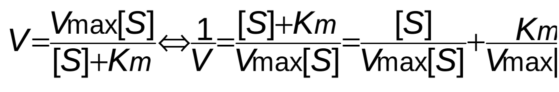
Expérimentalement, il n'est pas possible de déterminer Vmax ⇒ on ne connaît qu'une valeur approchée. On peut retrouver les deux valeurs importantes Vmax et Km grâce à différents traitements mathématiques, parmi lesquels la représentation en double inverse.

1. Lineweaver et Burk



Représentation en double inverse : 1/V = f (1/S)

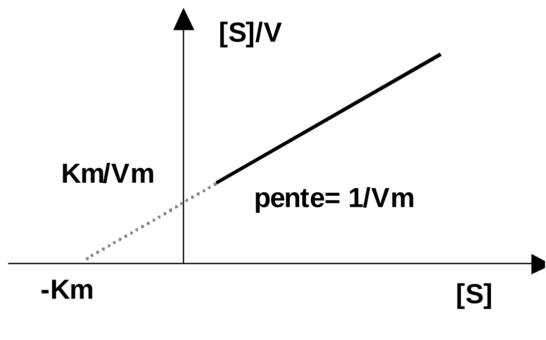
Le problème principal de cette méthode est la prépondérance accordée aux valeurs les plus faibles de S et de V, pour lesquelles l'incertitude est pourtant la plus grande. Elle peut conduire à des estimations fausses. Elle ne devient intéressante que pour des valeurs de [S] élevées, donc dans des conditions « saturantes ».



$$V=\frac{V\max[S]}{[S]+Km}\Leftrightarrow\frac{1}{V}=\frac{[S]+Km}{V\max[S]}=\frac{[S]}{V\max[S]}+\frac{Km}{V\max}$$

$$\frac{1}{V}=\frac{1}{[S]}\frac{Km}{V\max}+\frac{1}{V\max}$$

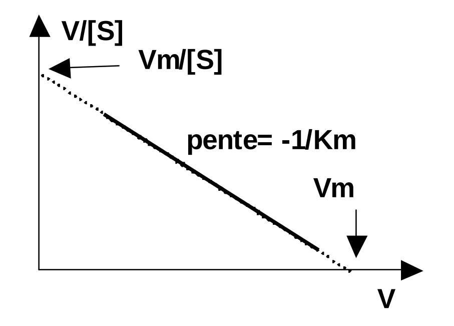
2. Hanes – Woolf



$$V=\frac{Vm[S]}{Km+[S]}\Leftrightarrow\frac{V}{[S]}=\frac{Vm}{Km+[S]},\ \text{soit}:\frac{[S]}{V}=\frac{Km+[S]}{Vm}$$

On utilise alors la relation : $\frac{[S]}{V}=\frac{1}{Vm}[S]+\frac{Km}{Vm}$

La droite a une pente de 1/Vm, dont l'extrapolation donne –Km à l'intersection avec l'axe des abscisses.



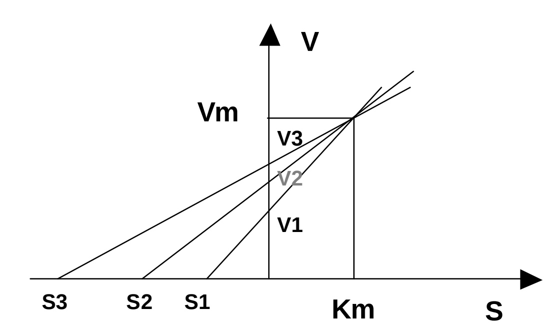
3. Eadie – Hoftsee

La relation utilisée est l'inverse de la précédente :

$$V=\frac{Vm[S]}{Km+[S]} \Leftrightarrow V(Km+[S])=Vm[S] \Leftrightarrow VKm+V[S]=Vm$$

$$\frac{V}{[S]}Km+V=Vm \Leftrightarrow \frac{V}{[S]}=\frac{Vm}{Km}-\frac{V}{Km}$$

La pente est –1/Km, les intersections avec les axes donnent Vm/[S] et Vm.



4. Représentation de Schwarzenbach

Méthode purement graphique : on reporte sur l'axe des abscisses les valeurs de –[S] et sur celui des ordonnées celles de V (pour des couples $S_{(i)}/V_{(i)}$ de résultats expérimentaux), et les droites se coupent en un point d'abscisse Km et d'ordonnée Vm.

E. Signification de Km

Rechercher Vmax ou 1/2 de Vmax correspond à la même démarche intellectuelle, sauf qu'une est possible expérimentalement, pas l'autre (cf. demi-vie des atomes marqués).

Km a la grandeur d'une concentration et représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat. On compare 2 substrats possibles d'une enzyme. Leurs Km respectifs sont différents (Km2 > Km1). Cela signifie que, pour atteindre Vmax2, il faut une concentration en S2 supérieure à la concentration en S1 nécessaire pour atteindre Vmax1 : "ça marche moins bien" avec S2. Caricature : si une substance n'est pas un substrat de l'enzyme, V = 0, même avec [S] $\Rightarrow \infty$

On envisage 3 cas.

1. [S] << Km

$v = \frac{Vm.[S]}{Km + [S]} \approx \frac{Vm}{Km}.[S] \Rightarrow v = A.[S]$ La concentration en substrat est limitante.

2. [S] @Km

$$v = \frac{Vm.[S]}{Km + [S]} \approx Vm.\frac{[S]}{[S]+[S]} \Rightarrow v = \frac{Vm}{2}$$

3. [S] >> Km

$$v = \frac{Vm.[S]}{Km + [S]} \approx Vm.\frac{[S]}{[S]} \Rightarrow v \ \mathbf{a}\ Vm$$

F. Constante catalytique Kcat

Kcat = nombre de moles de P formées par seconde et par mole d'enzyme.

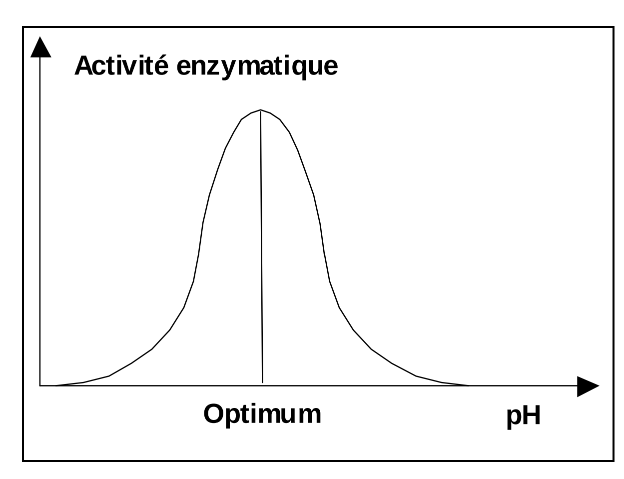
Si l'enzyme possède plusieurs sites catalytiques, l'unité change et s'exprime par mole de sites.

Kcat = Vmax / mole d'enzyme = Vmax / [Et]

Le rapport Kcat/Km est souvent donné comme mesure de l'efficacité catalytique, car il correspond à une constante de vitesse pour de basses concentrations de substrat (S) << Km, donc (E) = (ET)

$$v = \frac{Vm.[S]}{Km + [S]} \approx \frac{Kcat\,[E][S]}{Km}$$

IV. Influence des facteurs physico-chimiques



A. Influence du pH

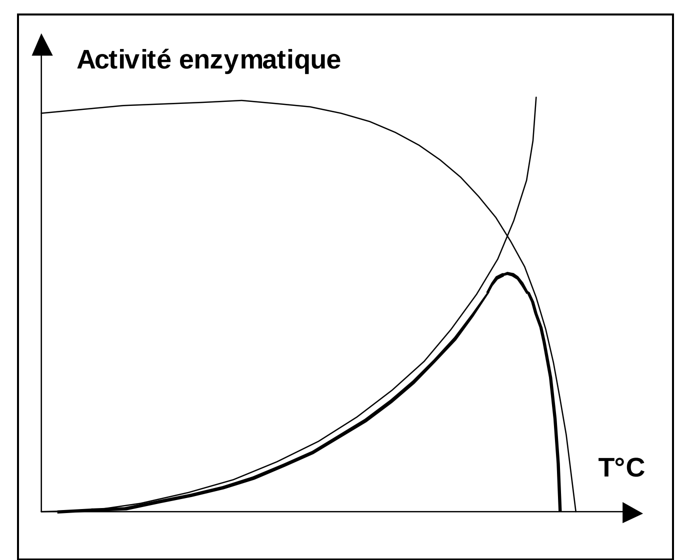
Le pH joue sur l'ionisation des molécules :

⇒ conformation de la protéine enzymatique ;

⇒ disponibilité des fonctions chimiques de l'enzyme et / ou du substrat (i.e. le substrat **réel** doit être sous une certaine forme, qui n'est pas nécessairement la forme de la neutralité).

En général, à 2 unités du pH optimum, l'activité est réduite 100 fois, mais parfois la gamme est beaucoup plus restreinte.

Valeurs extrêmes : il faut les atteindre pour qu'il y ait une dénaturation de l'enzyme par attaque acide ou basique, sinon, le plus souvent, c'est une inhibition réversible.



B. Influence de la température

1) Augmentation de la température : on fournit de l'énergie au système. Q_{10} = facteur d'augmentation de l'activité quand on augmente de 10°C ⇒ Q_{10} # 2

2) Dénaturation : la température à laquelle elle intervient peut varier, mais seules quelques exceptions s'éloignent vraiment de la gamme 40 - 60 °C (protéines thermostables).

V. Inhibition

Il ne s'agit pas ici des poisons, inhibiteurs irréversibles de l'enzyme.

Un inhibiteur d'une enzyme est un ligand, non transformé par l'enzyme, qui modifie le comportement de cette enzyme. De nombreux types d'inhibitions ont été décrits. Nous prendrons trois exemples : l'inhibition compétitive, l'inhibition non compétitive et l'inhibition incompétitive.

$[E_t]$ = enzyme totale, [S] = concentration initiale en substrat, [ES] complexe enzyme - substrat,

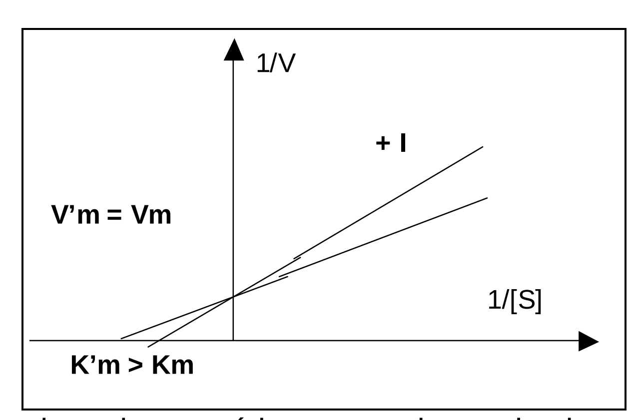
$[E_L]$ = enzyme libre

$[S] >> [E_t] \Rightarrow ([E_t] - [ES]) \cong [S]$ dans les conditions initiales.

$k_2[ES] = Vi$ / $k_2[E] = Vmax$

[I] = inhibiteur total, [EI] complexe inhibiteur - enzyme

$[I] >> [E_t] \Rightarrow ([E_t] - [EI]) \cong [I]$ pendant toute la réaction, puisque I n'est pas consommé.



A. Inhibition compétitive

L'inhibiteur ne peut se combiner avec l'enzyme en même temps que le substrat. Nous considérerons, bien que ce ne soit pas toujours le cas, que l'inhibiteur et le substrat s'excluent mutuellement, pour des raisons stériques, au niveau du site catalytique de l'enzyme. Ils ont souvent des structures analogues.

$$E+S \Leftrightarrow ES \Rightarrow E+P \text{ et } E+I \Leftrightarrow EI$$

On a :

$$[ES]=\frac{[Et][S]}{[S]+Km}, \text{d'où } [ES][S]+[ES]Km=[Et][S] \Leftrightarrow [ES]Km=[S]([Et]-[ES])=[S][E_L]$$

où : $Km = \frac{[S][EL]}{[ES]}$, soit encore $[EL] = \frac{[ES]Km}{[S]}$

De la même façon : $Ki = \frac{[I][EL]}{[EI]}$, on obtient donc : $[EI] = [EL]\frac{[I]}{Ki} = [ES]\frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki}$

1. Equation de conservation

Cette équation exprime le fait que toute l'enzyme est conservée au cours de la réaction.

$$[Et] = [EL] + [ES] + [EI] = [ES](1 + \frac{Km}{[S]} + \frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki}) = [ES][1 + \frac{Km}{[S]}(1 + \frac{[I]}{Ki})]$$

2. Equation de vitesse

On a Vi = k_2 [ES] et Vmax = k_2 [E_t], d'où :

$$\frac{vi}{V\max} = \frac{[ES]}{[Et]} = \frac{1}{1 + \frac{Km}{[S]}(1 + \frac{[I]}{Ki})}$$, d'où : $$vi = V\max\frac{[S]}{[S] + Km(1 + \frac{[I]}{Ki})}$$

et $\frac{1}{vi} = \frac{1}{V\max} + \frac{Km}{V\max[S]}(1 + \frac{[I]}{Ki})$

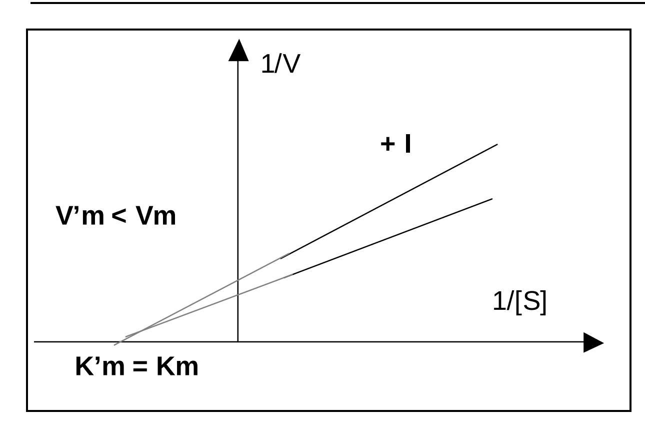
Quand on fait varier [I], les droites obtenues en double inverse se coupent, après extrapolation, en un point d'ordonnée 1/Vmax. ([I] = 0).

On peut lever l'inhibition par un excès de substrat.

En présence d'inhibiteur, la constante de Michaelis pour le substrat semble augmenter, l'inhibiteur entrant en compétition avec lui. L'affinité semble diminuer.

L'intersection de la droite avec l'axe des 1/[S] a pour abscisse :

$$-\frac{1}{K'm} = -\frac{1}{Km}\frac{1}{(1 + \frac{[I]}{Ki})} \Rightarrow K'm = Km(1 + \frac{[I]}{Ki})$$



B. Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se combine avec l'enzyme indépendamment du substrat : les deux peuvent donc se fixer simultanément. La fixation de I sur l'enzyme ne modifie pas Km. La fixation de S sur l'enzyme ne modifie pas Ki.

$E_L + S_L \Leftrightarrow ES \Rightarrow E_L + P \quad Km = \frac{[E_L][S]}{[ES]} \Rightarrow [E_L] = [ES]\frac{Km}{[S]}$

$E_L + I \Leftrightarrow EI \qquad Ki = \frac{[E_L][I]}{[EI]} \qquad [EI] = [ES]\frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki}$

$ES + I \Leftrightarrow EIS \qquad Ki = \frac{[ES][I]}{[EIS]} \qquad [EIS] = [ES]\frac{[I]}{Ki}$

$EI + S \Leftrightarrow EIS \qquad Km = \frac{[EI][S]}{[EIS]} \qquad [EIS] = [EI]\frac{[S]}{Km} = ([ES]\frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki})\frac{[S]}{Km}$

1. Equation de conservation

$$[Et] = [E_L] + [ES] + [EI] + [EIS] = [ES](\frac{Km}{[S]} + 1 + \frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki} + \frac{[I]}{Ki}) = [ES](1 + \frac{Km}{[S]})(1 + \frac{[I]}{Ki})$$

2. Equation de vitesse

$$\frac{vi}{Vm} = \frac{1}{(1+\frac{Km}{[S]})(1+\frac{[I]}{Ki})} = \frac{1}{1+\frac{[I]}{ki}+\frac{Km}{[S]}+\frac{Km}{[S]}\frac{[I]}{Ki}}$$

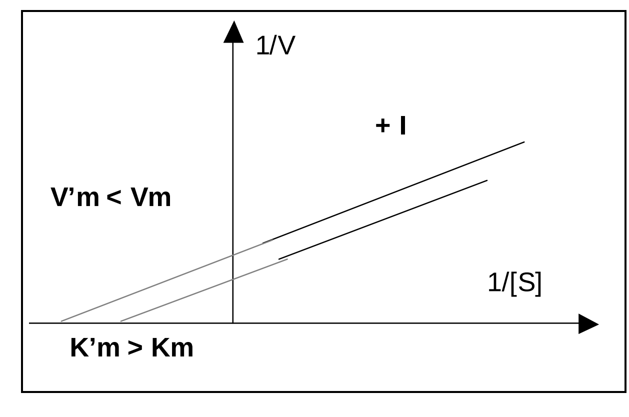
$$\frac{vi}{Vm} = \frac{[S]}{[S]+[S]\frac{[I]}{ki}+Km+Km\frac{[I]}{ki}} = \frac{[S]}{[S](1+\frac{[I]}{ki})+Km(1+\frac{[I]}{ki})}$$

$$\frac{vi}{Vm} = \frac{\frac{[S]}{(1+\frac{[I]}{ki})}}{Km+[S]} \Rightarrow vi = \frac{\frac{Vm}{(1+\frac{[I]}{ki})}[S]}{Km+[S]} \Leftrightarrow V'm = \frac{Vm}{(1+\frac{[I]}{ki})}$$

Quand on fait varier [I], les droites se coupent en un point d'abscisse -1/Km : l'inhibiteur ne modifie pas l'affinité du substrat pour l'enzyme.

En présence d'inhibiteur, la vitesse maximum, V'max, semble diminuée. Les droites coupent l'axe des ordonnées en un point :

$$\frac{1}{V'\max}=\frac{1}{V\max}(1+\frac{[I]}{Ki})$$



C. Inhibition incompétitive

E + S ⇔ ES ⇒ P

$$Km=\frac{[E_L][S]}{[ES]}\Leftrightarrow[ES]=[E_L]\frac{[S]}{Km}$$

ES + I ⇔ EIS

$$Ki=\frac{[ES][I]}{[EIS]}\Leftrightarrow[EIS]=\frac{[ES][I]}{Ki}=\frac{[E_L][S][I]}{Km.Ki}$$

$[E_t] = [E_L] + [ES] + [EIS]$, on remplace par les valeurs correspondantes :

$$[Et]=[E_L](1+\frac{[S]}{Km}+\frac{[S][I]}{Km.Ki})\Leftrightarrow[E_L]=\frac{[Et]}{1+\frac{[S]}{Km}+\frac{[S][I]}{Km.Ki}},\text{ or: }[E_L]=[ES]\frac{Km}{[S]}$$

On peut donc exprimer [ES] par rapport à $[E_t]$:

$$[ES]=\frac{[Et]}{\frac{Km}{[S]}(1+\frac{[S]}{Km}+\frac{[S][I]}{Km.Ki})}=\frac{[Et]}{\frac{Km}{[S]}+1+\frac{[I]}{Ki}}=\frac{[Et][S]}{Km+[S]+\frac{[I][S]}{Ki}}$$

$$[ES]=\frac{[Et][S]}{Km+[S](1+\frac{[I]}{Ki})}=\frac{\frac{[Et][S]}{(1+\frac{[I]}{Ki})}}{\frac{Km}{1+\frac{[I]}{Ki}}+[S]}\quad\text{or}\quad k2[ES]=Vi\quad\text{et}\quad k2[Et]V=V\max\text{, d'où}\quad Vi=\frac{[S]\frac{V\max}{(1+\frac{[I]}{Ki})}}{[S]+\frac{Km}{(1+\frac{[I]}{Ki})}}$$

$$v=\frac{V\max[S]}{Km+[S]}\Rightarrow V'\max=\frac{V\max}{1+\frac{[I]}{Ki}}\text{ et }K'm=\frac{Km}{1+\frac{[I]}{Ki}}$$

En présence d'un inhibiteur incompétitif, le substrat a une affinité apparente supérieure. Ici, Vmax et Km changent.

D. Inhibition par excès de substrat

Soit la réaction E + S ⇔ ES ⇒ P. On a : $Km = \frac{[S][EL]}{[ES]}$, soit encore $[EL] = \frac{[ES]Km}{[S]}$

Supposons qu'une deuxième molécule de substrat puisse se fixer sur le complexe ES et le rendre inactif : cette molécule se fixe sur un site différent du premier, et nous l'appellerons site inhibiteur. Cette molécule se comporte comme un inhibiteur :

ES + S ⇔ ESS ⇒ $Ki = \frac{[ES][S]}{[ESS]}$, soit encore $[ESS] = [ES]\frac{[S]}{Ki}$

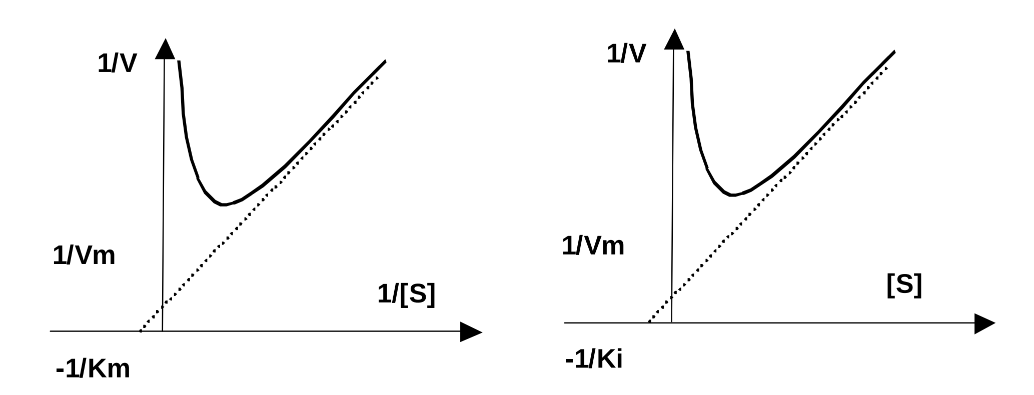
1. Equation de conservation

$$[Et] = [EL] + [ES] + [ESS] = [ES](1 + \frac{Km}{[S]} + \frac{[S]}{Ki})$$

2. Equation de vitesse

$$\frac{vi}{V\max} = \frac{[ES]}{[Et]} \Leftrightarrow vi = \frac{V\max}{1 + \frac{Km}{[S]} + \frac{[S]}{Ki}} \Rightarrow \frac{1}{vi} = \frac{1}{V\max}(1 + \frac{Km}{[S]} + \frac{[S]}{Ki})$$

Si [S] est grand, $\frac{[S]}{Km} \rightarrow \infty$ donc $(1 + \frac{Km}{[S]} + \frac{[S]}{Ki}) \rightarrow \infty$ soit $\frac{1}{vi} \rightarrow \infty \Leftrightarrow V \rightarrow 0$



Quand on porte **1/Vi en fonction de 1/[S]**, on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente Km/Vmax, coupe l'axe en un point -1/Km.

Quand on porte **1/Vi en fonction de [S]**, on obtient une hyperbole dont l'asymptote oblique, de pente 1/Vmax. Km coupe l'axe des [S] en un point d'abscisse -Ki.

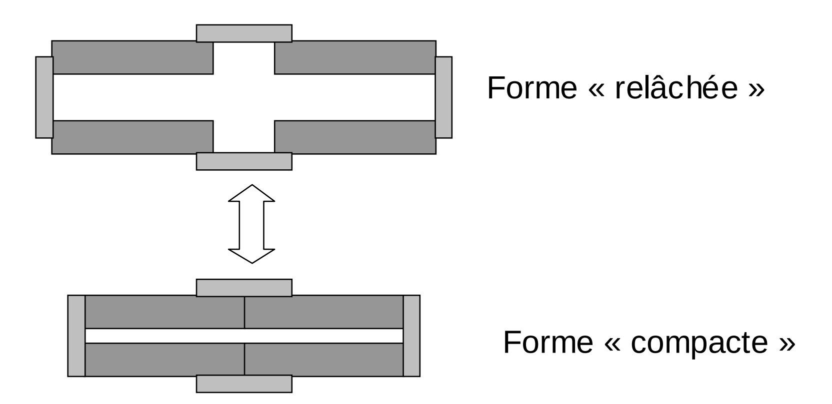
Dans les deux cas, Vi passe par un maximum pour $[S] = \sqrt{Km.Ki}$

VI. Allostérie

A. Considérations générales

1. Définition

L'allostérie désigne une variation de conformation de protéines sous l'effet de la fixation d'un substrat ou d'une molécule effectrice, d'où l'acquisition de propriétés particulières (changement d'activité.) On décrit cela comme des effets coopératifs. Ceux-ci sont concevables si et seulement si la macromolécule est sous forme oligomérique.



Exemple : un tétramère constitué de 4 sous-unités (monomères) à activité biologique et de 4 sous-unités de liaison.

La fixation d'un substrat entraîne une modification de l'ensemble de la structure. Toutes les sous-unités reproduisent à l'unisson la variation de conformation subie par l'une d'elles.

2. Propriétés d'une molécule allostérique

Il existe une structure quaternaire (en pratique, entre un dimère et un tétramère)

La variation de conformation de la structure dépend du taux d'occupation des sites de liaison.

Pour toutes les enzymes allostériques, la cinétique n'est pas michaélienne.

Ces molécules jouent des rôles clef dans la régulation du métabolisme.

3. Types

Il y a deux types d'enzymes allostériques :

Système K : la régulation se traduit par la variation de la fixation du substrat ou par la variation de l'affinité du substrat pour l'enzyme, d'où une variation du « Km »

Système V : la régulation porte sur la vitesse maximale. Dans ce cas, cela correspond à une variation de la constante k_2 des enzymes michaéliennes.

B. Structure et fonction de l'ATCase

L'aspartate transcarbamylase (ATCase) est impliquée dans la régulation des bases pyrimidiques.

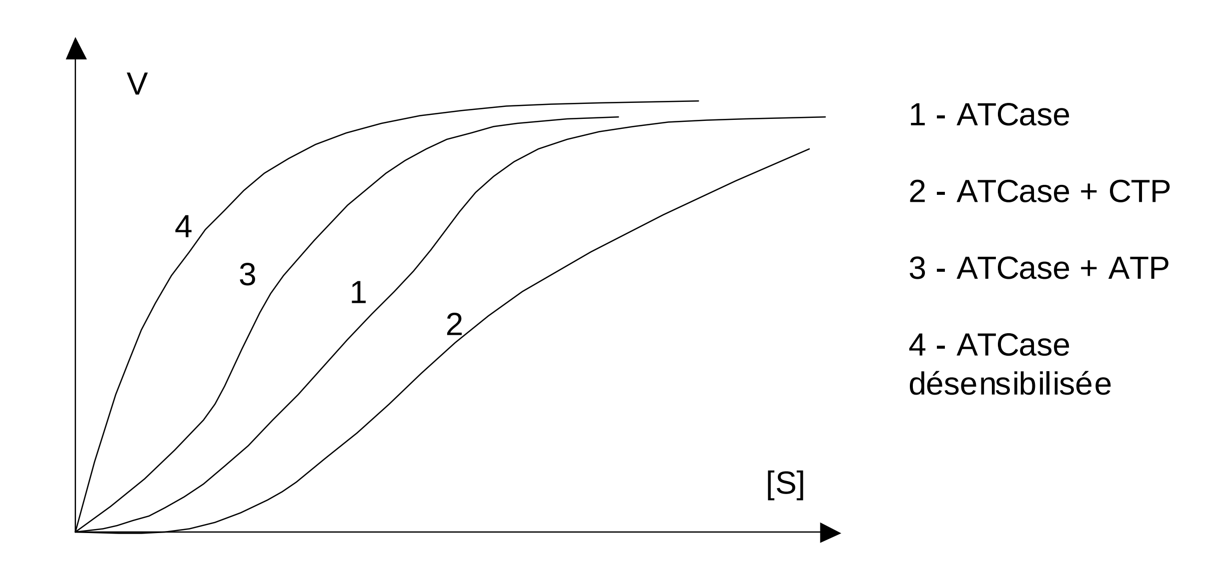
Réaction :

H_2N–C(=O)–O–P + -OOC–CH(NH_3+)–COO- ⟷ (ATCase) -OOC–CH_2–CH(COO-)–NH–C(=O)–NH_2 + Pi

Carbamyl-P   Aspartate   Carbamyl-aspartate

On suit la cinétique d'apparition du produit par mesure de DO_{465}.

1. Cinétique de l'ATCase



Les courbes sont des sigmoïdes : l'aspartate joue un rôle d'effecteur coopératif positif sur l'activité de l'enzyme : à faible concentration en substrat, la vitesse n'est pas

élevée ; plus on élève la concentration, plus la vitesse prend l'allure d'une courbe de Michaelis.

Le CTP joue un rôle négatif sur l'ATCase : inhibition de l'activité.

En présence d'ATP, il y a activation de l'ATCase : c'est un effecteur positif.

Quand l'ATCase est désensibilisée (par un agent chimique), il n'y a plus de régulation : les propriétés allostériques sont perdues.

2. Interprétation

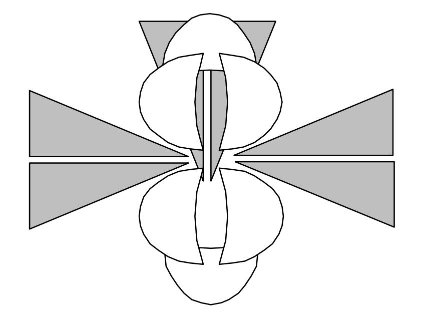
La régulation allostérique correspond au « frein moteur » de l'activité enzymatique : avec le CTP, la vitesse diminue comme quand on lève le pied ; avec l'ATP, elle augmente comme quand on accélère.

CTP : la molécule de base est la cytosine. Quant trop de cytosine est produite, le produit de fin de chaîne va réguler l'enzyme en amont de la voie de synthèse : rétrocontrôle négatif.

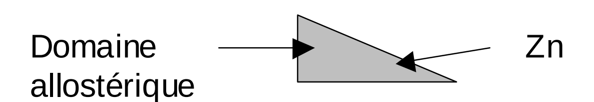
ATP : quand il y a beaucoup d'adénine (base purique), il y a activation de la synthèse des bases pyrimidiques : rétrocontrôle positif.

L'allostérie est donc un outil de réglage fin, de régulation directe, instantanée, qui n'est pas du même ordre que, par exemple, l'activation de l'opéron Lactose qui est un système très lourd.

3. Structure de l'ATCase



L'enzyme est formée de 2 trimères qui sont le support de l'activité catalytique et de trois dimères qui sont les sous-unités régulatrices.



La sous-unité régulatrice possède un domaine allostérique et un site de fixation du zinc qui permet l'interaction avec les trimères.

La sous-unité catalytique possède un domaine équatorial pour la fixation de l'aspartate et un domaine polaire pour la fixation du carbamyl-phosphate.

L'oligomère présente deux formes, la forme « T » inactive (compacte) et la forme « R » active (relâchée).

4. Effets homotropes ou hétérotropes

[T] ⇔ [R] avec $K_{éq}$.

En présence de substrat :

R + S ⇔ RS **à** R + P

Mais, quand on augmente [S], on induit la formation de RS, et donc une diminution de [R] libre, d'où un passage de la forme T à la forme R, d'où une diminution de T dans la cellule : Le substrat S joue un rôle homotrope positif.

En présence d'un effecteur positif (ATP) :

On a toujours équilibre entre les formes T et R, mais cette fois R se lie aussi à E :

T ⇔ R + E **à** RE + S **à** …

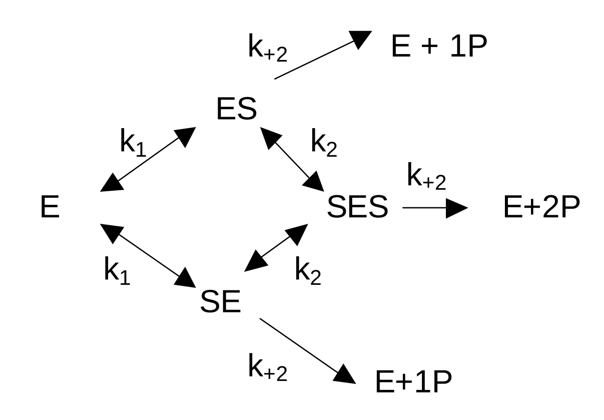
Donc [R] diminue, donc transition T **à** R, donc diminution de [T] libre. Effet hétérotrope positif.

En présence d'un effecteur négatif (CTP)

L'effecteur se lie à la forme T pour former un complexe TE, d'où une diminution de la forme T libre, transition de R vers T et diminution de la forme R, ce qui correspond à une inactivation de l'enzyme. Effet hétérotrope négatif sur l'enzyme.

C. Approche théorique de la coopérativité

1. Cas d'une enzyme à 2 sous-unités catalytiques



Deux sous-unités distinctes ont permis la fixation du substrat sur l'enzyme.

$$k_1 = \frac{E.S}{ES} = \frac{E.S}{SE} \Rightarrow ES = SE = \frac{E.S}{k_1}$$

$$k_2 = \frac{ES.S}{SES} = \frac{SE.S}{SES} \Rightarrow SES = SE\frac{S}{k_2} = \frac{E.S^2}{k_1.k_2}$$

v = k_{+2}.ES + k_{+2} SE + 2 k_{+2} SES

Et = E + ES + SE + SES

En remplaçant les valeurs par les expressions trouvées précédemment, on obtient :

$$v = 2k_{+2}E\left[\frac{S}{k_1} + \frac{S^2}{k_1k_2}\right] \text{ et } Vm = 2k_{+2}Et = 2k_{+2}.E\left[1 + \frac{2S}{k_1} + \frac{S^2}{k_1.k_2}\right]$$

D'où : $$\frac{v}{Vm} = \frac{\frac{S}{k_1} + \frac{S^2}{k_1.k_2}}{1 + \frac{2S}{k_1} + \frac{S^2}{k_1.k_2}}$$

On envisage alors deux cas :

à La fixation du premier substrat est sans effet sur celle du second : il n'y a donc pas de différence entre k_1 et k_2.

$\frac{v}{Vm} = \frac{S}{K_D + S}$, avec $K_D = k_1 = k_2$, d'où : $v = \frac{Vm.S}{K_D + S}$ et si k_{+2} est très faible, K_D = Km : il n'y a pas de régulation allostérique, c'est une enzyme michaélienne.

à La fixation du premier substrat modifie celle du second : k_1 # k_2.

$$\frac{v}{Vm} = \frac{k_2.S + S^2}{k_1.k_2 + 2k_2.S + S^2}$$

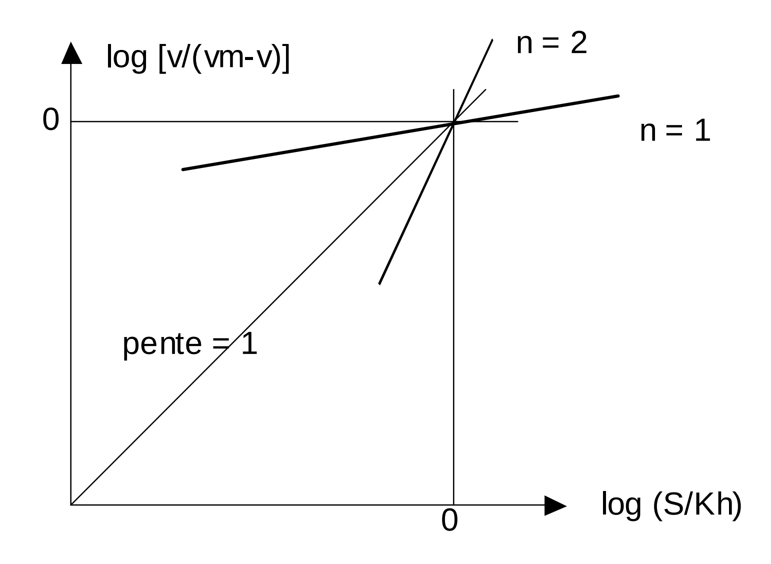
Quand $k_2 << k_1$, la fixation du second substrat est facilitée par celle du premier, et que $k_2 < S < k_1$: $v = \frac{Vm.S^2}{k_1.k_2 + S^2}$

2. Généralisation de l'équation

Dans le cas d'une régulation allostérique, on a :

$v = \frac{Vm.S^n}{Kh + S^n}$, avec n = nombre de sites catalytiques et $Kh = k_1 \times k_2 \times ... k_n$

$vKh + vS^n = Vm.S^n \Rightarrow \frac{v}{Vm - v} = \frac{S^n}{Kh} \Rightarrow \log\left(\frac{v}{Vm - v}\right) = n.\log\left(\frac{S}{Kh}\right)$



n = 1 : pas de régulation allostérique

à ou régulation allostérique par coopérativité négative du substrat

n = 2 : régulation allostérique avec 2 sous-unités catalytiques.

Remarque :

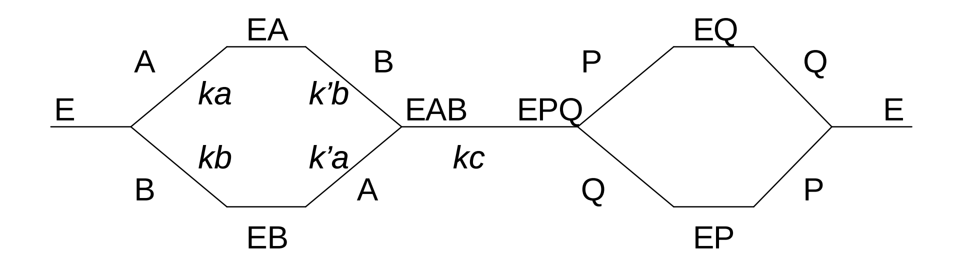
n = nombre de Hill = nombre de sous-unités à régulation allostérique. Exemples :

- Phosphofructokinase : n = 4
- Lactate DH : il y a 4 sous-unités, mais n = 1 : pas de régulation allostérique.

On prend les pentes des droites au niveau des valeurs nulles sur les axes.

VII. Réactions à deux substrats

A. Fixation aléatoire



k'a et k'b sont différents de ka et kb : l'enzyme est modifiée par sa liaison à A ou à B.

En conditions de vitesse initiale, la vitesse de retour est négligeable. Comme l'étape limitante est la formation de EPQ à partir de EAB, on se contente d'exprimer V à partir de la concentration en EAB : v = *kc.* [EAB].

[Et] = [E] + [EA] + [EB] + [EAB] et Vm = *kc.* [Et].

1. Démonstration de l'équation

1) $ka = \frac{[E].[A]}{[EA]} \Rightarrow [EA] = [E]\frac{[A]}{ka}$

2) $kb = \frac{[E].[B]}{[EB]} \Rightarrow [EB] = [E]\frac{[B]}{kb}$

3) $k'a = \frac{[EB].[A]}{[EAB]} \Rightarrow [EAB] = [EB]\frac{[A]}{k'a} = [E]\frac{[B].[A]}{kb.k'a}$

4) $k'b = \frac{[EA].[B]}{[EAB]} \Rightarrow [EAB] = [EA]\frac{[B]}{k'b} = [E]\frac{[B].[A]}{k'b.ka}$

En conditions de vitesse initiale, [EAB] = constante, d'où :

5) k'a.kb = ka.k'b

$$[Et] = [E]\left(1 + \frac{[A]}{ka} + \frac{[B]}{kb} + \frac{[A].[B]}{k'a.kb}\right) \Leftrightarrow [E] = \frac{[Et]}{1 + \frac{[A]}{ka} + \frac{[B]}{kb} + \frac{[A].[B]}{k'a.kb}}$$

or, d'après la relation 4 : $[E] = \frac{[EAB]}{[A].[B]}.ka.k'b$, d'où :

$$[EAB]=\frac{[Et]}{\frac{ka.k'b}{[A].[B]}\left(1+\frac{[A]}{ka}+\frac{[B]}{kb}+\frac{[A].[B]}{k'a.kb}\right)}=\frac{[Et]}{\frac{ka.k'b}{[A].[B]}+\frac{k'b}{[B]}+\frac{k'a}{[A]}^{*}+1^{*}}$$ (NB : * d'après la relation 5)

soit : $v=\frac{Vm}{1+\frac{k'a}{[A]}+\frac{k'b}{[B]}+\frac{ka.k'b}{[A].[B]}}$ ou $v=\frac{Vm}{1+\frac{k'a}{[A]}+\frac{k'b}{[B]}+\frac{k'a.kb}{[A].[B]}}$

Signification des constantes : ka et kb sont les constantes de formation des complexes EA et EB, k'a et k'b sont les constantes de dissociation. En prenant différents cas, on a :

1) $[B]$ saturant, $[A]=k'a \Rightarrow v=\frac{Vm}{1+1+0^{+}+0^{+}}\approx\frac{Vm}{2}\Rightarrow k'a=K_m^A$

2) Réciproque : $k'b=K_m^B$

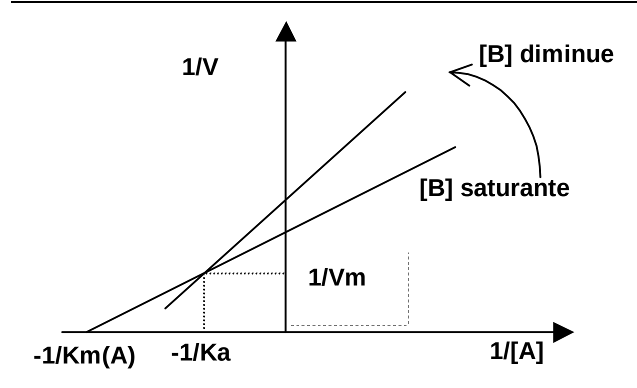
$$\Rightarrow v=\frac{Vm}{1+\frac{K_m^A}{[A]}+\frac{K_m^B}{[B]}+\frac{ka.K_m^B}{[A].[B]}}$$

2. Représentation graphique

a 1/v = f(1/[A])

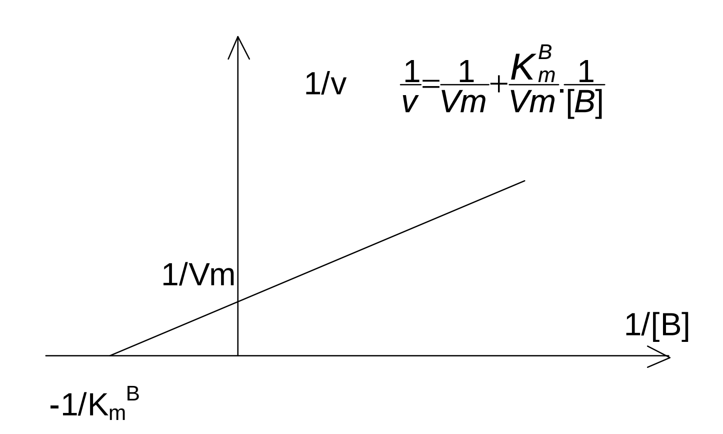
$$v=\frac{Vm}{1+\frac{K_m^A}{[A]}+\frac{K_m^B}{[B]}+\frac{K_m^A\,kb}{[A]\,[B]}}\Rightarrow\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_m^A}{[A]}+\frac{K_m^B}{[B]}+\frac{K_m^A\,kb}{[A]\,[B]}\right)=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_m^B}{[B]}\right)+\frac{K_m^A}{Vm}\left(1+\frac{kb}{[B]}\right)\frac{1}{[A]}$$

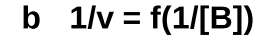
- [B] = constante : y = ax + b
- [B] saturante : $\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}+\frac{K_m^A}{Vm}.\frac{1}{[A]}$
- [B] limitante : expression complète
- $\frac{1}{[A]}=0\Rightarrow\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_m^B}{[B]}\right)$
- $[A]=-ka\Rightarrow\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_m^B}{[B]}+\frac{K_m^A}{[A]}+\frac{ka\,K_m^B}{[A]\,[B]}\right)=\frac{1}{Vm}\left(1-\frac{K_m^A}{[A]}\right)\Rightarrow\forall\,[B],\,1/v=\text{cste}$



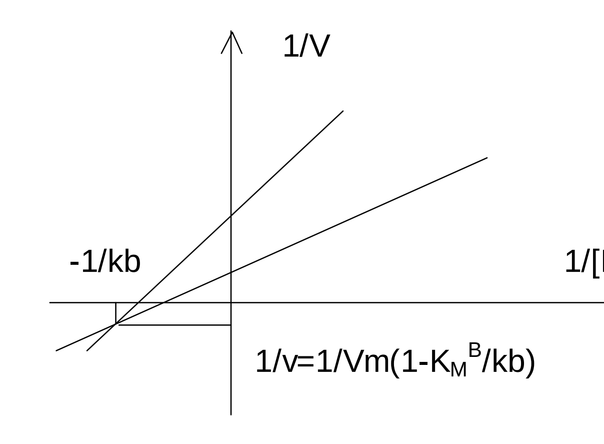
On peut donc déterminer ka, K_m^A, K_m^B, Vm, mais pas kb !

Pour déterminer kb, on réalise un **graphique secondaire** : on prend les valeurs de 1/v pour les différentes [B] quand 1/[A] = 0 (les intersections de l'axe des ordonnées) :





b 1/v = f(1/[B])



$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^A}{[A]} + \frac{K_m^B}{[B]} + \frac{ka}{[A]} \cdot \frac{K_m^B}{[B]}\right) ou ... \frac{K_m^A}{[A]}\frac{kb}{[B]})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}(1 + \frac{K_m^A}{[A]}) + \frac{K_m^B}{[B]}(1 + \frac{ka}{[A]})$$

Si [A] est saturante **à** Michaelis – Menten à un substrat

Si [B] = - kb **à** $\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}(1 - \frac{K_m^B}{kb})$, $\forall$ [A]

Il faut là aussi faire un graphique secondaire pour obtenir tous les paramètres.

c Remarques particulières

Quand on fait varier [A] et que [A] = -ka, 1/V > 0 ;

Quand on fait varier [B] et que [B] = - kb, 1/V < 0, donc :

K_M^A / ka < 1 : la fixation de A est facilitée quand B est déjà fixé (l'affinité est supérieure) ;

K_M^B / kb > 1 : la fixation de B est meilleure sur l'enzyme libre

è la fixation de substrats dépend de l'état de l'enzyme.

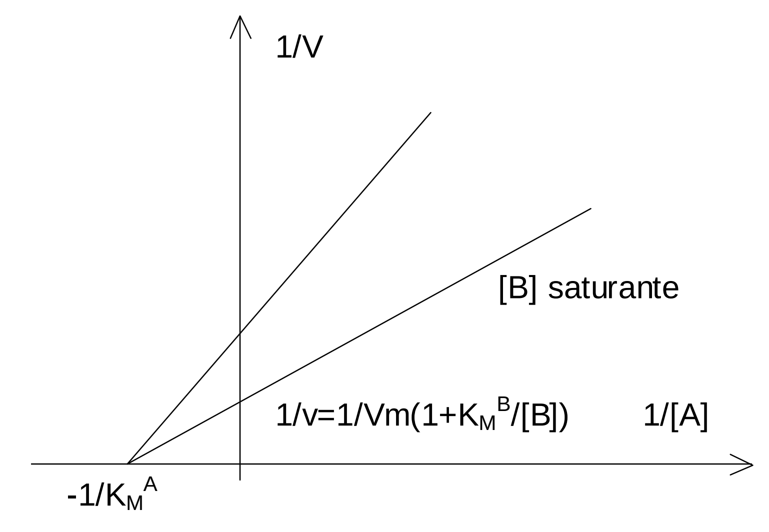
d Fixation indépendante des substrats

K_M^A = ka et K_M^B = kb : la fixation d'un substrat n'est pas affectée par la fixation de l'autre. Dans ce cas :

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_M^A}{[A]}+\frac{K_M^B}{[B]}+\frac{K_M^A K_M^B}{[A]\,[B]}\right)$$

en développant :

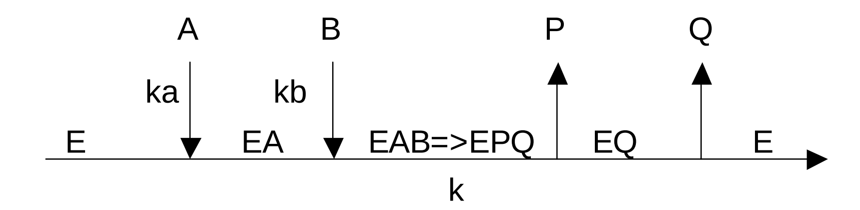
$$\frac{1}{v}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_M^B}{[B]}\right)+\frac{K_M^A}{Vm}\left(1+\frac{K_M^B}{[B]}\right)\frac{1}{[A]}=\frac{1}{Vm}\left(1+\frac{K_M^A}{[A]}\right)+\frac{K_M^B}{Vm}\left(1+\frac{K_M^A}{[A]}\right)\frac{1}{[B]}$$



Faire le graphique secondaire.

B. Mécanisme ordonné

1. Equation



$$ka = \frac{E.A}{EA} \Rightarrow EA = E.\frac{A}{ka} \qquad kb = \frac{EA.B}{EAB} \Rightarrow EAB = EA.\frac{B}{kb} = E.\frac{A}{ka}.\frac{B}{kb}$$

$$Et = E + EA + EAB = E(1 + \frac{A}{ka} + \frac{A.B}{ka.kb}) \Rightarrow E = \frac{Et}{1 + \frac{A}{ka} + \frac{A.B}{ka.kb}}$$

$$\text{or } E = EAB\frac{ka.kb}{A.B} \Rightarrow EAB = \frac{E}{\frac{ka.kb}{A.B}} = \frac{Et}{\frac{ka.kb}{A.B}(1 + \frac{A}{ka} + \frac{A.B}{ka.kb})}$$

$$\Rightarrow v = \frac{Vm}{1 + \frac{kb}{B} + \frac{ka.kb}{A.B}}$$

Si A → ∞ et B = kb ⇒ v=Vm / [1 + 1 + 0^+] # Vm/2 ⇒ kb=K_m^B

KmA = 0 : A ne peut quitter le complexe ternaire EAB tant que B est en place.

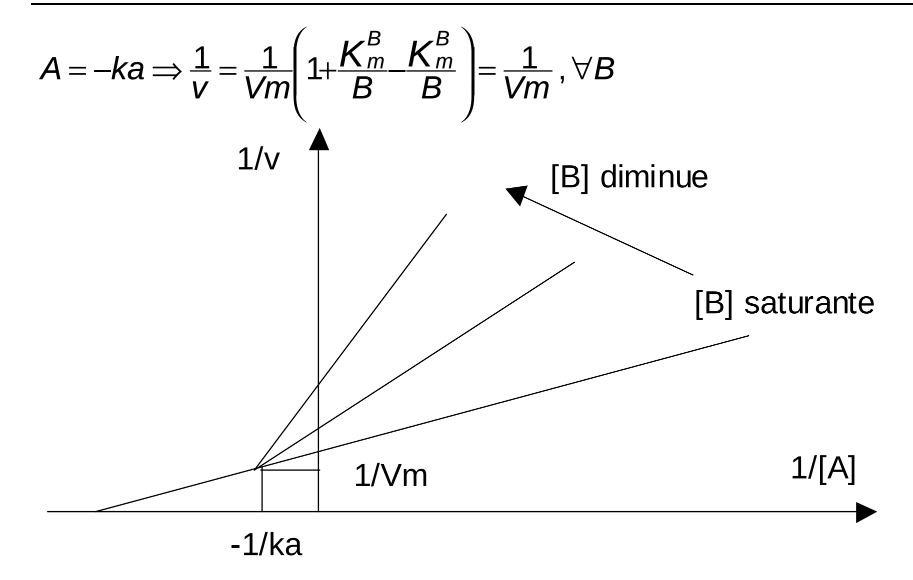
2. Représentations graphiques

a 1/v=f(1/A)

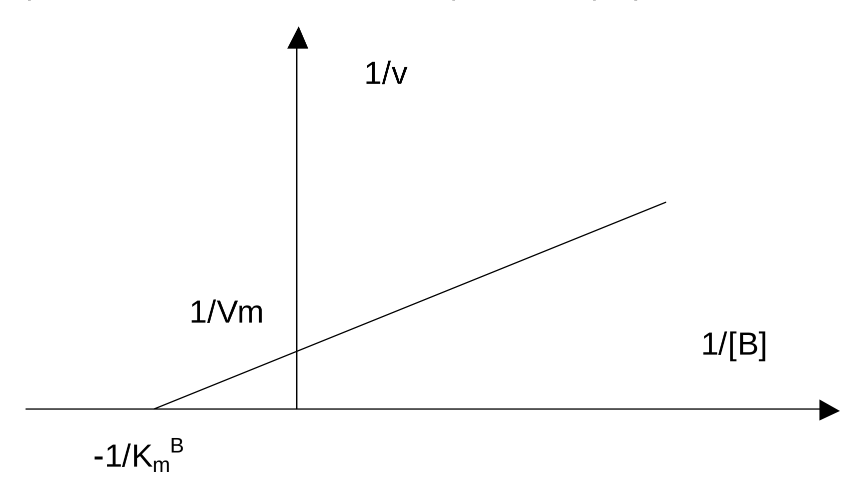
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^B}{B} + \frac{ka.K_m^B}{B}.\frac{1}{A}\right)$$

$$\frac{1}{A} = 0 \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^B}{B}\right)$$

$$A = -ka \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^B}{B} - \frac{K_m^B}{B}\right) = \frac{1}{Vm}, \forall B$$

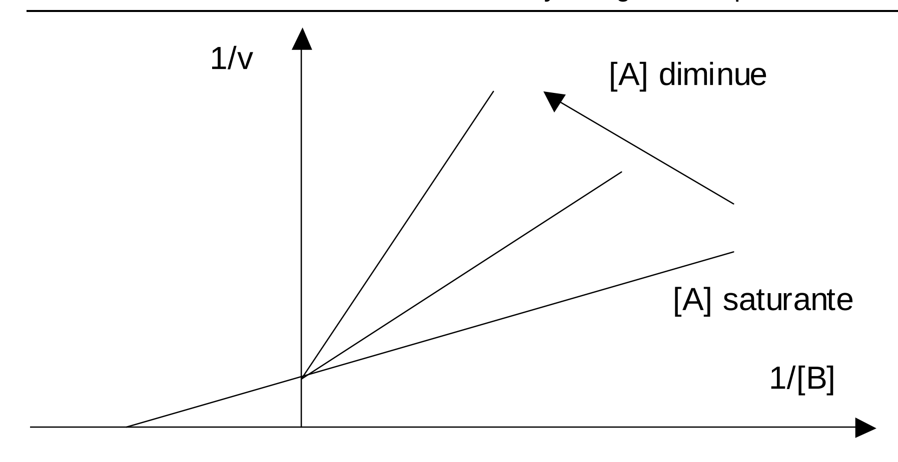


A partir des valeurs de V pour 1/A = 0, on trace un **graphique secondaire**, qui représente la droite 1/v = 1/Vm (1 + K_m^B/B), qui a l'allure des droites michaéliennes :



b 1/v=f(1/B)

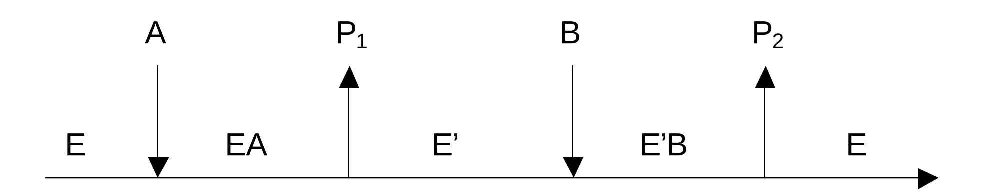
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^B}{B} + \frac{ka.K_m^B}{A.B}\right) = \frac{1}{Vm} + \frac{K_m^B}{Vm}\left(1 + \frac{ka}{A}\right)\frac{1}{B}$$



$A\ \mathbf{a}\ \infty \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{1}{Vm} + \frac{K_m^B}{Vm}.\frac{1}{B}$, cf. Michaelis – Menten

$\forall A$, quand $\frac{1}{B} = 0 \Rightarrow \frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{Vm}$, donc il n’y a pas de graphique secondaire, puisque 1/v = constante.

C. Mécanisme alternatif



$$E + A \underset{k1}{\overset{k-1}{\Leftrightarrow}} EA \underset{k3}{\Rightarrow} E' + P_1 \rightarrow E' + B \underset{k2}{\overset{k-2}{\Leftrightarrow}} E'B \underset{k4}{\Rightarrow} E + P_2$$

1. Equations

Démonstration en conditions de vitesse initiale, donc avec toutes les concentrations constantes.

On obtient finalement une relation symétrique par rapport à A et B (donc on ne traite qu'un seul cas ci-dessous) : $v = \dfrac{Vm}{1 + \dfrac{K_m^B}{B} + \dfrac{K_m^A}{A}}$

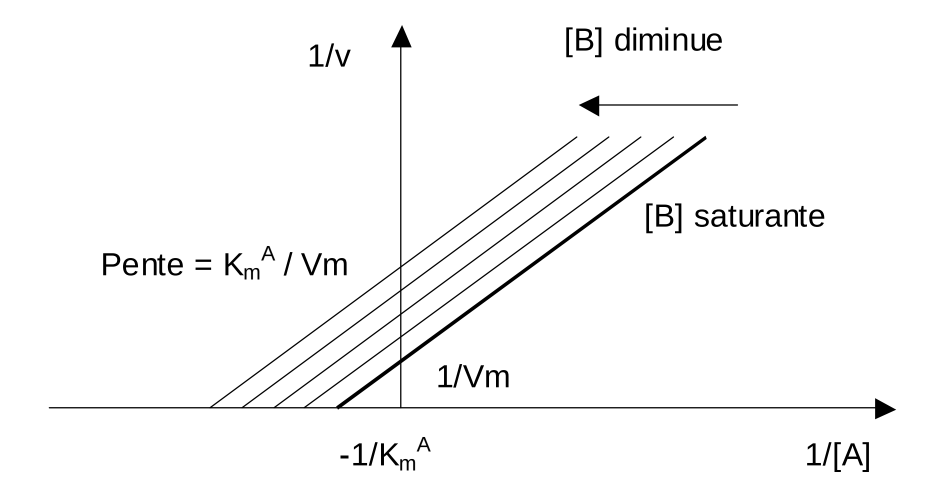
2. Représentation graphique

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^A}{A} + \frac{K_m^B}{B}\right) = \frac{1}{Vm}\left(1 + \frac{K_m^B}{B}\right) + v\frac{K_m^A}{Vm}\cdot\frac{1}{A}$$

$$\text{Si } B\ \mathbf{a}\ \infty,\ \frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{Vm} + \frac{K_m^A}{Vm}\cdot\frac{1}{A}\ \text{(cf. Michaelis - Menten)}$$

$$\text{Si } \frac{1}{\mathrm{A}} = 0 \Rightarrow \frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{\mathrm{Vm}}\left(1 + \frac{K_m^B}{B}\right)$$

$$\text{si } \frac{1}{\mathrm{v}} = 0 \Rightarrow \frac{1}{\mathrm{A}} = -\frac{1}{\mathrm{K_m^B}}\left(1 + \frac{K_m^B}{B}\right)$$


1/v
[B] diminue
[B] saturante
Pente = K_m^A / Vm
1/Vm
-1/K_m^A
1/[A]